

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.08.05

# 重组杆状病毒表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的优化及蛋白免疫原性研究

李天增, 潘晓梅, 张伟, 师小潇, 徐龙飞, 贺笋\*

(天康生物股份有限公司, 乌鲁木齐 830032)

[收稿日期] 2019-05-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 08-0030-06 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为获得高蛋白含量和良好免疫原性的抗原, 利用杆状病毒表达体系进行猪圆环病毒 2 型(PCV2)重组 Cap 蛋白表达, 采取正交试验设计确定三因素(High five 细胞浓度、病毒感染量、蛋白表达时间)的最佳组合, 对重组病毒株 vBac-SP-PCV2 的表达条件进行优化, 利用 His Bind 蛋白质纯化试剂盒对表达产物进行纯化, 纯化蛋白作为标准蛋白用于 Western blotting 中蛋白质定量分析和蛋白免疫原性检测。结果显示:  $2.0 \times 10^6$ /mL High five 细胞浓度、1.5 MOI 病毒感染量、蛋白表达时间 168 h 为重组 PCV2-rCap 蛋白表达的最佳条件, 表达产物纯化良好, 并能被 PCV2 多克隆抗体识别, 免疫豚鼠可诱导产生高水平 PCV2 抗体。研究表明纯化 PCV2-rCap 蛋白可作为标准蛋白用于后续表达蛋白的定量分析和 PCV2 亚单位疫苗研发候选抗原。

**[关键词]** PCV2-rCap 蛋白; 表达; 纯化; 免疫原性

## The Optimization and Its Immunogenicity by the Recombinant Baculovirus Virus Expressed Capsid Protein of Porcine Circovirus Type 2

LI Tian-zeng, PAN Xiao-mei, ZHANG Wei, SHI Xiao-xiao, XU Long-fei, HE Sun\*

(Xinjiang Tecon Animal Husbandry Biotechnology Co., Ltd, Urumqi 830011, China)

Corresponding author: E-mail: hesun@tecon-bio.com

**Abstract:** Porcine circovirus type 2 (PCV2) recombinant Cap protein was expressed by baculovirus expression system in order to obtain antigen with high protein content and good immunogenicity. Optimum conditions of three factors (cell concentration, virus infective dose, time) for protein expression has been confirmed by orthogonal test. The purified protein was obtained by use of His · Bind affinity chromatography. The purified protein was observed by SDS-PAGE electrophoresis and was further confirmed by Western blotting. The purified protein as standard protein applied to quantifying Protein expression in Western blotting analysis, to protein of immunogenicity determination. Results showed that  $2.0 \times 10^6$ /mL High five cell concentration, 1.5 MOI,

作者简介: 李天增, 助理畜牧师, 从事疫病防控研究。

通讯作者: 贺笋。E-mail: hesun@tecon-bio.com

infection time of 168 hours were the optimum condition for expression proteins. The results showed that the recombinant Cap had been well purified and could react with the polyclonal antibody against PCV-2. The results of Protein expression in Western blotting analysis were in agreement with the quantitative approach to computation of protein expression percentage. The purified protein could induce high titer of the specific PCV2 antibodies in guinea pig. The purified protein as standard protein applied to quantifying protein expression. It is an ideal antigen candidate of recombinant sub-unit vaccines.

**Key words:** Cap protein; expression; purification; immunogenicity

猪圆环病毒病 (Porcine circovirus disease, PCVD) 是由猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起的猪传染性疾病, 自 1997 年 Clark 等首次分离 PCV2 以来, 该病已给全世界养猪业造成了巨大的经济损失。目前, PCV2 在我国猪群中普遍存在, 能够引起免疫抑制、混合感染和继发感染, 严重危害养猪业的发展<sup>[1-3]</sup>。

PCV2 属于圆环病毒科、圆环病毒属, 病毒无囊膜, 病毒粒子直径约为 17 nm, 基因组为单链环状 DNA, 大小为 1767 bp 或 1768 bp, 有 11 个阅读框, 其中 ORF1 和 ORF2 是最主要的阅读框。ORF2 大小为 702 bp, 编码 233 个氨基酸, 是病毒的主要结构蛋白(核衣壳蛋白)<sup>[4]</sup>, 具有良好的免疫原性, 是构建重组疫苗和检测的首选基因, 目前已在不同系统中得到有效表达<sup>[5-7]</sup>。因此, 本试验利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统对 PCV2-rCap 蛋白优化表达进行了研究, 以期今后开发 PCV2 亚单位疫苗奠定基础。

## 1 材料

1.1 重组病毒株 重组病毒株 vBac-SP-PCV2 由天康生物股份有限公司构建和保存。High-five 细胞购自 Invitrogen 公司。

1.2 试剂 Ni-NTA Purification System 为 Invitrogen 公司产品; 蛋白预染 Marker 购自 Thermo Fisher 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗猪二抗购自 Sigma 公司; 猪源 PCV2 多克隆抗体由天康生物股份有限公司制备。TEMED 购自北京鼎国生物技术有限公司; 咪唑为 SIGMA 公司产品, 其他试剂为进口或国产分析纯试剂。

## 2 方法

### 2.1 vBac-SP-PCV2 表达条件的优化

2.1.1 High five 细胞浓度的确定 用 SFX 培养基将 High five 细胞浓度调整为  $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $3.0 \times 10^6/\text{mL}$ , 每瓶总量 100 mL, 分别加入 2 MOI 病毒感染量重组杆状病毒, 细胞置于 26~28 °C 培养箱中振荡培养, 分别于接毒后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h、216 h、240 h 定时取样, 每次收集 5 mL 细胞混悬液。

2.1.2 病毒感染量和蛋白表达时间的确定 用 SFX 培养基将 High five 细胞浓度调整为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ , 总量 100 mL, 分别加入 0.25、0.5、1、1.5、2、3 MOI 病毒感染量重组杆状病毒, 细胞置于 26~28 °C 培养箱中振荡培养, 分别于接毒后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h、216 h、240 h 定时取样, 每次收集 5 mL 细胞混悬液。

2.2 表达产物的分析 将以上收取样品于 4 °C 以 10000 r/min 离心 10 min, 收集表达后细胞沉淀, 加入裂解液, 于冰浴中进行超声破碎 10 min (功率 200 W, 1/2 探头, 破碎 30 s, 间歇 30 s), 超声结束后于 4 °C 以 12000 r/min 离心 10 min, 分别取上清进行 Western blotting 分析。

2.3 重组蛋白的纯化和浓缩 将大批表达 PCV2-rCap 蛋白的细胞液以 10000 r/min 离心 10 min 收集细胞沉淀, 超声破碎, 离心收集上清, 用 His Bind Purification Frits 进行纯化。将细胞裂解物 10~15 mL 加入准备好的含有 8 mL 填料的纯化柱中。4 °C 轻柔振荡结合过夜, 以保持细胞裂解产物

能始终混悬填料。静止,让 Ni - NTA 琼脂糖填料靠重力的作用自己沉降完全澄清。放出上清液,上清液取样。将 30 mL PBS 加入纯化柱中,不断轻柔换向扣敲纯化柱混悬 Ni - NTA 琼脂糖。静止,让 Ni - NTA 琼脂糖填料靠重力的作用自己沉降完全澄清。放出上清液,PBS 洗脱 2 次。上清液取样存放于 4 ℃ 进行 SDS - PAGE 分析。固定好柱子,使用 5 mL 的洗脱液洗脱蛋白。收集 1 mL 的洗脱液用于 SDS - PAGE 分析,BCA 法检测蛋白浓度。

**2.4 Cap 蛋白纯化浓缩产物的 SDS - PAGE 和 Western blotting 分析** 取蛋白样品 60  $\mu\text{L}$  与 20  $\mu\text{L}$  4  $\times$  上样 buffer 混合,进行 SDS - PAGE 及 Western blotting 分析。然后将 SDS - PAGE 胶上的蛋白条带转移到 PVDF 膜上,置含 5% 的脱脂奶粉的 PBST 中,4 ℃ 封闭 30 min,清洗,加入稀释 1:500 倍一抗猪源 PCV2 多克隆抗体,4 ℃ 缓慢振荡过夜;清洗,加入稀释 1:5000 倍含辣根过氧化物酶标记的兔抗猪的二抗,室温作用 1 h,清洗,于暗室内进行显色。

**2.5 纯化蛋白的电镜观察** 将纯化浓缩蛋白吸取 3  $\mu\text{L}$  铺在经特殊处理的喷碳的铜网上,1 min 后用滤纸吸干,用 5% 磷钨酸 pH7.0 负染 1 min,干燥后用电子显微镜进行观察蛋白分子形状。

**2.6 纯化的 PCV2 - rCap 免疫原性试验** 纯化蛋白配制疫苗,免疫豚鼠,以相同剂量相同方式分别进行二次免疫。免疫后每周采血,离心取血清,采用 IFA 检测 PCV2 Cap 蛋白抗体效价。56 ℃ 水浴槽 30 min。在 PCV2 抗原盘盖子上写好标示。将所有孔加入 75  $\mu\text{L}$  3% PBA。在第 1 排每孔加入 25  $\mu\text{L}$  血清样品(第 1 排血清稀释倍数为 4 倍)。之后为连续 4 倍稀释血清。第 12 排为阴性空白对照孔(PCV2 阴性血清样本)。置于 4 ℃ 感作 12 h。去除一抗后,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 PBST,洗板 4 次。将每孔的 PBST 倒干后,每孔加入以 1% PBA 稀释二抗 Goat anti mouse FITC 50  $\mu\text{L}$ ,置 25 ℃ 感作 4 h。去除二抗后,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 PBST,洗板 4 次。将每孔的 PBST 倒干后,再加入 50  $\mu\text{L}$  PBST,并于

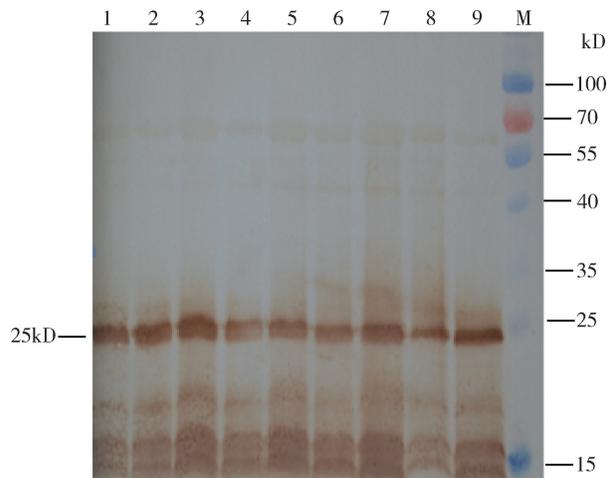
倒立荧光显微镜下判读荧光细胞。

### 3 结果与分析

#### 3.1 最佳蛋白表达条件的确定

**3.1.1 最佳 High five 细胞浓度的确定** 重组 PCV2 - rCap 蛋白表达试验,按 2MOI 接种病毒时,当细胞密度不低于  $2.0 \times 10^6/\text{mL}$ ,培养时间为 168 h,蛋白含量最高。

**3.1.2 最佳病毒感染量和蛋白表达时间的确定** 以  $2.0 \times 10^6/\text{mL}$  High five 细胞浓度,不同病毒感染量、蛋白表达时间进行蛋白表达条件优化,根据不同的接毒量和表达时间表达的重组 PCV2 - rCap 蛋白(细胞沉淀超声后上清) Western blotting AlphaEaseFC 软件灰光度值分析结果,筛选出表达量相对较高的 0.25 MOI(168 h 和 192 h)、0.5 MOI(192 h 和 216 h)、1 MOI(168 h)、1.5 MOI(168 h)、2 MOI(144 h)、3 MOI(168 h) 8 个杆状病毒表达的重组 PCV2 - rCap 蛋白,进行下一步的最佳接毒量和表达时间的筛选试验。由图 1 AlphaEaseFC 软件灰光度值分析结果:确定  $2.0 \times 10^6/\text{mL}$  High five 细胞浓度、1.5 MOI 病毒感染量、蛋白表达时间 168 h 为重组 PCV2 - rCap 蛋白表达的最佳条件。



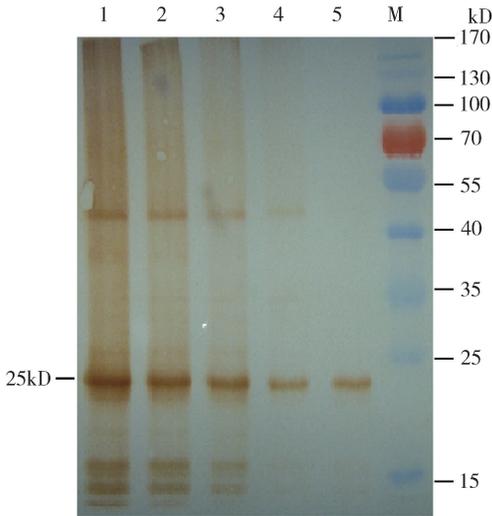
1:2.0MOI-192h; 2:1.5MOI-192h; 3:1.5MOI-168h; 4:1.0MOI-192h; 5:1.0MOI-168h; 6:0.5MOI-168h; 7:0.5MOI-144h; 8:0.25MOI-192h; 9:0.25MOI-168h; M:Marker

图 1 重组 PCV2 - rCap 蛋白 Western blotting 分析

Fig 1 Western blotting analysis of recombinant

PCV2 - rCap protein

3.2 重组蛋白的纯化和浓缩 将细胞沉淀超声破碎离心收集上清用 His Bind 过柱纯化,收集洗脱液进行 Western blotting 分析,图 2 结果表明,在纯化浓缩液中蛋白条带大小与重组蛋白吻合,说明重组蛋白已经得到纯化,且纯度较高。



1-6: 70、35、17.5、8.75、4.38 μg/mL 纯化 PCV2-rCap 蛋白; M: Marker

图 2 纯化重组 PCV2-rCap 蛋白

Western blotting 定量分析

Fig 2 Purified recombinant PCV2-rCap protein quantitative analysis by Western blotting

3.3 纯化重组蛋白用于 Western blotting 中蛋白质定量分析 BCA 法检测纯化蛋白浓度约 1 mg/mL。Western blotting 中蛋白质定量分析,稀释的标准蛋白采用软件线性拟合曲线分析  $R^2 = 0.99$ ,在可信度范围( $R^2 \geq 0.95$ )之内,可用于蛋白定量分析。

3.4 纯化 PCV2-rCap 蛋白的电镜观察 PCV2b ORF2 基因编码蛋白经昆虫细胞表达系统表达后具有正常的结构和功能,能够形成病毒样颗粒,大小均匀,直径为 20 nm 左右(图 3)。

3.5 纯化的 PCV2-rCap 免疫原性试验 纯化蛋白配制疫苗,免疫豚鼠,免疫 7 日后即有抗体产生,免疫 21 日后所有豚鼠抗体均转阳,免疫 28 日抗体达到较高水平(图 4、图 5),表明蛋白的免疫原性好,能高效诱导机体产生良好的体液免疫。

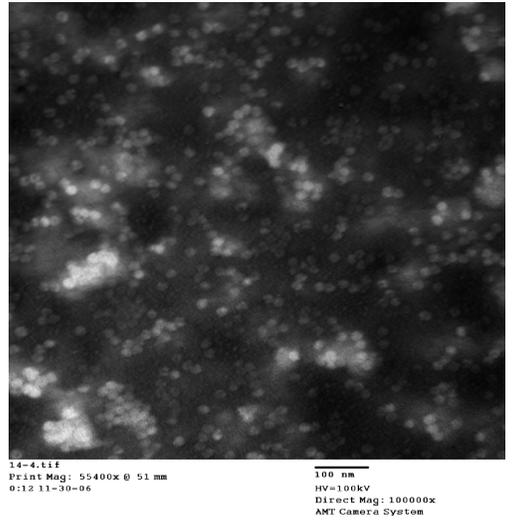
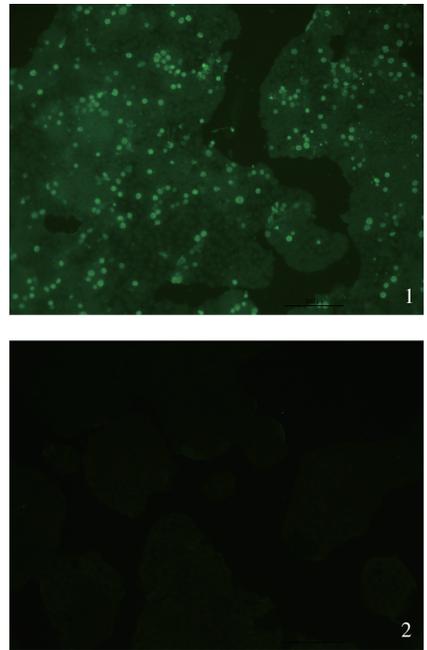


图 3 纯化浓缩重组蛋白的病毒样颗粒图(100nm)

Fig 3 Virus-like particle diagram of purified recombinant protein concentration (100nm)



1: PCV2 阳性血清抗体效价 1:4096 (100 倍); 2: 阴性血清 (100 倍)

图 4 IFA 检测 PCV2 阳性血清抗体结果(彩图)

Fig 4 IFA detection of PCV2 positive serum results (color map)

#### 4 讨论与结论

杆状病毒表达系统为高效表达外源蛋白表达体系,目的蛋白在昆虫细胞内能够正确折叠、二硫

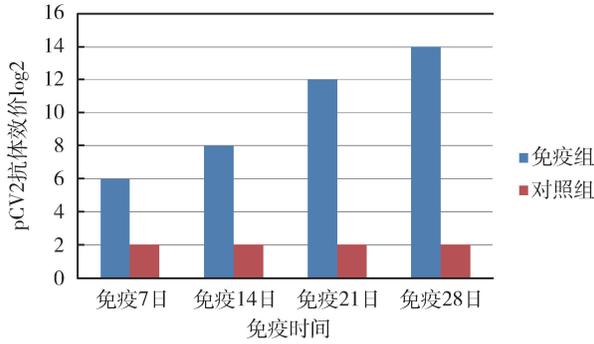


图5 免疫豚鼠 PCV2 抗体结果分析图

Fig 5 Results of immune guinea pig PCV2 antibody analysis

键的搭配及寡聚物的形成,表达产物在结构及功能上接近天然蛋白<sup>[8]</sup>。病毒感染复数、病毒感染时间、细胞密度等是影响杆状病毒表达系统为高效表达的关键因素<sup>[9-10]</sup>,因此本研究对影响杆状病毒表达系统为高效表达的关键因素进行探讨研究优化。结果显示,当细胞密度不低于  $2.0 \times 10^6/\text{mL}$  时,随着病毒感染复数增加到一个临界值 1.5MOI 后,蛋白表达量不再增加;随着病毒感染时间延长,蛋白表达量不断增加,168 h 为峰值,192 h 蛋白表达量略有下降,进一步说明病毒感染复数和病毒感染时间是影响蛋白表达量的重要因素。

本研究利用昆虫细胞杆状病毒表达系统表达了 Cap 蛋白,电镜观察显示形成了病毒样颗粒,同时在重组蛋白的 C 末端设计了 His. tag 序列,外源基因与组氨酸标签融合表达,为重组蛋白的纯化创造了条件<sup>[11-12]</sup>,提高了纯化效率,同时不会因为插入组氨酸标签影响外源基因蛋白的活性,为进一步研发猪圆环病毒的亚单位疫苗奠定了基础。

蛋白百分比定量方法定量是基于普通的蛋白电泳,目的蛋白处有可能有降解的蛋白沉降此处,会导致蛋白定量偏高。而 Western blotting 分析是指将蛋白质样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后转移至到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜)上,然后用抗体通过免疫学反应检测目的蛋白,是抗原抗体的特异性反应<sup>[13]</sup>,因此本试验的定量更为准确。

## 参考文献:

- [1] Shibahara T, Sato K, Ishikawa Y, *et al.* Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs wasting disease syndrome [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2000, 62 (11): 1125 - 1131.
- [2] 朗洪武,张广川,吴发权. 断奶猪多系统衰竭综合征血清抗体检测[J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(3): 3 - 5.  
Lang H W, Zhang G C, Wu F Q. Detection of serum antibody in weaned pigs with multiple system failure syndrome [J]. *Chinese Veterinary Science and Technology*, 2000, 30 (3): 3 - 5.
- [3] Kennedy S, Allan G, McNeilly F, *et al.* Porcine circovirus infection in Northern - Ireland [J]. *Vet Rec*, 1998, 142 (18): 495 - 496.
- [4] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul P S, *et al.* Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1, PCV2 [J]. *J Virol*, 2004, 78 (15): 8135 - 8145.
- [5] 刘长明,陆月华,张超范,等. 猪圆环病毒 2 型重组 Cap 蛋白在昆虫杆状病毒中的表达 [J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(6): 479 - 482.  
Liu C M, Lu Y H, Zhang C F, *et al.* Expression of porcine circovirus type 2 recombinant Cap protein in insect baculovirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 27 (6): 479 - 482.
- [6] 陈春丽,郭宇飞,陈筱薇,等. 利用 SUMO 系统高效表达可溶性的 PCV2 Cap 蛋白 [J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(3): 393 - 397.  
Chen C L, Guo Y F, Chen X W, *et al.* The soluble PCV2 Cap protein was expressed efficiently by SUMO system [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2012, 33 (3): 393 - 397.
- [7] 宋云峰,肖少波,曹胜波,等. 猪 2 型圆环病毒 Cap 蛋白在伪狂犬病毒中的表达 [J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(2): 155 - 158.  
Song Y F, Xiao S B, Cao S B, *et al.* Expression of Cap protein of porcine circovirus type 2 in pseudorabies virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 27 (2): 155 - 158.
- [8] 欧阳素贞,张福良,王双山,等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白重组腺病毒的构建及表达 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(3): 165 - 168.  
Ouyang S Z, Zhang F L, Wang S S, *et al.* Construction and expression of porcine circovirus type 2 Cap protein recombinant adenovirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30 (3): 165 - 168.

- [9] 曹蕾,伊瑶,宋敬东,等. 杆状病毒表达 EV71 病毒样颗粒的装配、制备纯化与鉴定 [J]. 病毒学报, 2012, 28 (3): 201 - 205.
- Cao L, Yi Y, Song J D, *et al.* Assembly, preparation, purification and identification of baculovirus EV71 virus - like particles [J]. *Journal of Virology*, 2012, 28 (3): 201 - 205.
- [10] 吴芳明,韩春光,彭明丽,等. 人 GPR81 - Gi1 $\alpha$  融合蛋白在杆状病毒系统中的表达及优化 [J]. 生物技术通报, 2008, 增刊: 149 - 154.
- Wu F M, Han C G, Peng M L, *et al.* Expression and optimization of human gpr81 - gi1 alpha fusion protein in baculovirus system [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, supplement: 149 - 154.
- [11] Koho T, Mantyla T, Laurimki P, *et al.* Purification of noroviruses - like particles (VLPs) by ion exchange chromatography [J]. *J Virol Methods*, 2012, 181 (1): 6 - 11.
- [12] 张春雷,靳立明,叶昱,等. 介导分泌表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组杆状病毒的构建 [J]. 华南农业大学学报, 2013, 34 (4): 564 - 568.
- Zhang C L, Jin L M, Ye Y, *et al.* Construction of recombinant baculovirus mediating secretion of porcine circovirus type 2 Cap protein [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34 (4): 564 - 568.
- [13] 宋月,姜艳萍,崔文,等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在杆状病毒系统表达及鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43 (3): 36 - 41.
- Song Y, Jiang Y P, Cui W, *et al.* Expression and identification of porcine circovirus type 2 Cap protein in baculovirus system [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43 (3): 36 - 41.

(编辑:李文平)